

氏 名	加 藤 日路士
生 年 月 日	
本 籍	埼玉県
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博甲第 527 号
学位授与の日付	2002 年 9 月 30 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	Haptenic antigen recognition in skin sensitization'-Protein binding and MHC restriction-（皮膚感作性におけるハプテン抗原の認識－蛋白との結合と MHC 拘束性－）
論文審査委員(主査)	福森 義宏（理学部・教授）
論文審査委員(副査)	和田敬四郎（自然科学研究科・教授） 櫻井 勝（理学部・教授） 中西 義信（医学系研究科・教授） 岩見 雅史（自然科学研究科・助教授）

学 位 論 文 要 旨

Summary

Skin sensitization potential of haptens was assessed by analyzing formation of peptide-conjugate. Chemicals were incubated with a peptide, glutathione, and resultant mixtures were analyzed by mass spectrometry. Twenty chemicals were assessed, and new peaks corresponding chemical-peptide conjugates were detected for 13 of 14 known sensitizers. Conjugates were not detected for 4 negative chemicals. The method has advantages as a simple screening assay for assessing sensitization potential of chemicals.

To examine the effect of haplotype on haptenic antigen recognition, mouse ear swelling tests were performed using different strains of mice with some of carbodiimide compounds such as dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and positive control chemicals. While BALB/c mice exhibited strong responses for the carbodiimide compounds, C3H/HeN mice demonstrated no reactions. Other strains, C57BL/6 and DBA/1 also showed responses to DCC, but CBA/J mice with the same haplotype as C3H/HeN (H-2^k) did not. Based on the findings, there may be a specific unresponsiveness to DCC dependent on the H-2^k haplotype.

アレルギー性接触皮膚炎はⅣ型アレルギーに分類される遅延型過敏反応であり、T細胞によって媒介される免疫反応である。多くの化学物質が皮膚感作性（アレルギー性接触皮膚炎誘発能）を有し、そのような低分子の化学物質はハプテンと呼ばれる。ハプテンは最初の暴露で皮膚中の蛋白と結合し、分解されたペプチドがランゲルハンス細胞等の抗原提示細胞上の主要組織適合抗原（MHC）分子と結合する。抗原提示細胞はリンパ節に移行して T 細胞に対して抗原を提示する。T 細胞は MHC 分子とペプチドとの複合体を T 細

胞レセプターによって認識する。その結果、抗原特異的な T 細胞が選択的に増殖して全身に移行し、2 回目以降の暴露において皮膚局所で抗原提示細胞と反応してサイトカインを産生し、紅斑や浮腫等の局所反応を形成すると考えられている。ハプテンは単独では免疫反応を惹起できず、蛋白と結合し MHC 上に提示されることが免疫系に認識されるために必須である。本研究では、皮膚感作性における毒性学的課題である個人差の要因解明及びスクリーニング試験法の開発を目標として、ハプテンの蛋白への結合及び MHC 拘束性の 2 点について検討を行った。

1. 新しい皮膚感作性スクリーニング試験法の開発

皮膚感作性を評価するための新しい方法として化合物とペプチドとの反応性に着目し、グルタチオンとの結合と皮膚感作性の相関性を検討した。化合物とグルタチオンを混合し、結合物を質量分析を用いて検出した。20 化合物について調べた結果 (Table 1)、皮膚感作性を有する 14 化合物中 13 化合物で結合物が検出された。また、皮膚感作性のない 4 化合物ではいずれも結合物は検出されなかった。グルタチオンとの結合には SH 基が関与していると考えられた。マウスを用いる皮膚感作性試験 (LLNA) と比較した結果、LLNA での感作性の強さと結合物の検出との間には相関性が認められた。以上の結果から、本方法は化合物の皮膚感作性スクリーニングに有用であると考えられた。

Table 1. Formation of conjugates

Chemical	Conjugate with glutathione
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+
<i>Trans</i> -Cinnamaldehyde	+
Dicyclohexylcarbodiimide	+
Ethyl nitrosourea	+
1,2-Epoxyoctane	+
Fluorescein isothiocyanate	+
Formaldehyde	+
Glutaraldehyde	+
Maleic anhydride	+
Methyl methanesulfonate	+
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	+
Methyl salicylate	-
Phenol	-
<i>p</i> -Phenylenediamine	-
Phthalic anhydride	+
Resorcinol	-
Sodium lauryl sulfate	-
Trinitrobenzene sulfonic acid	+
Compound 1	+
Compound 2	+

+ : Detected, - : Not detected.

2. 皮膚感作性の MHC 拘束性

化合物が結合したペプチドは MHC に提示されるが、蛋白やペプチドの場合には MHC の多型性が免疫反応の応答性に影響することが知られており、ハプテンの場合に MHC がどのように影響するか興味のあるところであった。ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 及びジ-*p*-トリルカルボジイミド (DTC) 等のマウスを用いた皮膚感作性試験 (Mouse ear swelling test) を実施したところ、いずれの化合物でも BALB/c マウスでは顕著な反応が認められたのに対して C3H/HeN マウスでは反応は認められなかった (Fig. 1)。C57/BL6 や DBA/1 等の他系統のマウスでは反応が認められる一方で、C3H/HeN と同じ *k* ハプロタイプを有する CBA/J では反応が認められなかった。他の陽性対照化合物ではこのような系統差は認められなかった。したがって、カルボジイミド化合物に対して H-2 の *k* ハプロタイプが選択的に応答しないと考えられた。交差反応性を調べた結果、DIC 感作/DCC 誘発で交差性が認められたが、他の組み合わせでは認められず、抗原としては異なるものであることが確認された。DCC は IL-4 の発現及びリンパ球の増殖を誘導したが、その作用は BALB/c で顕著であった。本研究は皮膚感作性に MHC が影響することを *in vivo* で示した初めての報告であり、MHC が皮膚感作性の個体差の要因となる可能性を示唆するものである。

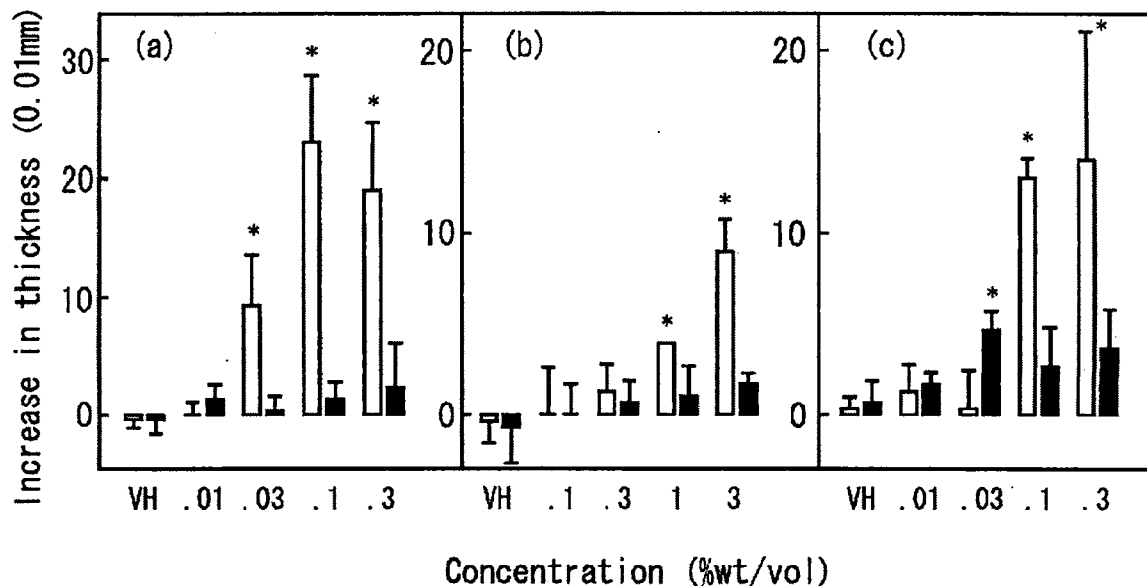


Fig. 1. Comparison of ear swelling responses to carbodiimides in BALB/c (□) and C3H/HeN (■) mice. Mice were treated with a) dicyclohexylcarbodiimide (DCC), b) diisopropylcarbodiimide (DIC) and c) di-*p*-tolylcarbodiimide (DTC) at indicated concentrations for three consecutive days and challenged by the maximum non-irritating dose on fifth day after the last induction. Increases in ear thickness were measured 24hours after challenge. Values represent the means \pm S.D. of three animals.

* represents $p < 0.05$ vs vehicle control (VH).

学位論文審査結果の要旨

当該論文に対する個別審査後、平成 14 年 8 月 5 日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

本論文は、皮膚感作性を評価するための新しい皮膚感作性スクリーニング試験法と、皮膚感作性の主要組織適合抗原分子が皮膚感作性の個体差の要因となる可能性を検討した結果を記述したものである。本論文による研究成果は以下の通りである。

- (1) 皮膚感作性を評価するための新しい方法として化合物とペプチドとの反応性に着目し、グルタチオンとの結合と皮膚感作性の相関性を検討した。その結果、皮膚感作性を有する 14 化合物中 13 化合物で結合物を検出し、マウスを用いる皮膚感作性試験での感作性の強さと結合物の検出との間には相関性があることを示した。
- (2) ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 等のカルボジイミド化合物のマウスを用いた皮膚感作性試験を実施したところ、C3H/HeN 等の k ハプロタイプを有するマウスでのみ反応が認められなかった。交差反応性を調べた結果、カルボジイミド化合物は抗原としては異なるものであり、カルボジイミド化合物の反応性が MHC と抗原ペプチドとの結合に影響している可能性を示した。

以上の様に、本論文で開発された新しい皮膚感作性スクリーニング試験法や皮膚感作性におけるハプテン抗原の認識、特に、蛋白との結合と MHC 拘束性についての新規な知見は当該分野の発展に大きく寄与するものである。よって、本論文は博士（理学）論文に値すると認める。